

DESARROLLO y VALIDACIÓN: RESIDUOS DE DROGAS VETERINARIAS en MÚSCULO, HÍGADO, RIÑÓN Y GRASA por LCMSMS

V. Uchitel⁽¹⁾, y M. F. Toledo⁽¹⁾

(1) Instituto Nacional de Tecnología Industrial, Centro Oriental

INTI, Ruta 14 Km 124 Concepción del Uruguay, Entre Ríos, Argentina | vuchitel@inti.gov.ar

1. Resumen

El presente método fue desarrollado y validado como soporte analítico de los estudios de depleción de un grupo de drogas veterinarias utilizadas como antiparasitarios y antibióticos en la producción de carne para consumo humano en diferentes tejidos de las especies ovina y bovina. Los analitos estudiados fueron: spinosad A y D, fipronil, fipronil sulfona, cipermetrina, enrofloxacina y ciprofloxacina en las matrices músculo, hígado y riñón de las especies bovina y ovina. En el caso de la matriz grasa no se incluyeron las quinolonas. La extracción y clean-up se realizó por un método QuEChERS modificado con determinación final por LCMSMS. Los rangos de trabajo van de 0,35 a 3500 µg/kg dependiendo del analito y de la matriz analizada. La validación se realizó en un laboratorio que trabaja bajo la Norma ISO 17025. Los parámetros validados de: linealidad, repetibilidad, reproducibilidad intermedia, LD, LQ, robustez, recuperación e incertidumbre cumplieron con los requerimientos establecidos por el órgano contralor.



LCMSMS Xevo TQD Waters – INTI Entre Ríos

2. Extracción y clean-up:

En un principio un método similar de extracción y clean-up (1) se utilizó para analizar fipronil y fipronil sulfona, sin embargo para incluir compuestos del grupo de las fluoroquinolonas en músculo, riñón e hígado se debieron realizar 2 modificaciones al método original: la adición de un 5% de AcH al AcN de extracción y la eliminación de PSA de la etapa de clean-up. Diagrama de los métodos:



Compuesto	ESI	Voltage capilar (kV)	Ion madre	Ion hija	VC (kV)	EC (kV)
Cipermetrina	+	3.0	433.3	191.0	25	15
			416.2	35	8	
Deltametrina	+	3.0	523.0	281.0	15	15
			506.0	15	10	
Fipronil	-	0.6	435.0	250.0	30	25
Fipronil sulfona	-	0.6	451.0	330.0	30	15
			415.0	30	16	
Fipronil desulfinil	-	0.6	387.0	351.0	30	14
Enrofloxacina	+	3.0	360.3	316.3	25	20
			342.3	25	20	
Ciprofloxacina	+	3.0	332.1	288.1	28	18
			314.1	28	22	
Enrofloxacina-d5	+	3.0	365.2	321.1	25	20

El extracto es diluido en FM: relación 1:2 para músculo, riñón e hígado y 1:5 para grasa. Un estudio de robustez demostró que no había diferencias estadísticamente significativas entre las recuperaciones usando 4 a 48 horas de extracción en shaker para músculo, hígado y riñón.

3. Método LCMSMS

Es único para las 4 matrices validadas y los 11 compuestos. Los extractos son inyectados en un Acquity Waters Xevo TQD en columna C18 Acquity BEH 2.1 x 100 mm 1,7 µm con FMA: MeOH 5mM formiato de amonio (FA) -0,1% ácido fórmico (AF) y FMB: Agua 5mM FA - 0,1% AF en gradiente de 8 minutos. La adición de FA a la fase móvil permitió incluir a los piretroides entre los analitos analizados, sin embargo bajo la sensibilidad del método para las quinolonas. Los cromatogramas corresponden a recuperados a nivel LD en músculo.

Compuesto	ESI	Voltage capilar (kV)	Ion madre	Ion hija	VC (kV)	EC (kV)
Spinosad A	+	3.0	732.6	98.1	56	59
			142.0	56	31	
Spinosad D	+	3.0	746.5	98.1	53	51
			142.0	51	31	
Abamectina	+	3.0	890.5	305.1	24	25

4. Validación

La validación se realizó con curvas de calibrado de estándares surrogates preparados en la misma tanda y relativizando al correspondiente IS (fipronil desulfinil para grupo fipronil, enrofloxacina-d5 para quinolonas y deltametrina para cipermetrina; para Spinosad A+D no se usó IS sino abamectina como QC de recuperación). El estudio de linealidad se realizó para cada analito y para cada matriz con 7 puntos de concentración. Los valores de LD obtenidos teóricamente de la curva de conc teórica vs conc hallada fueron corroborados experimentalmente.

El estudio de precisión se realizó con 2 analistas que realizaron ensayos sobre fortificaciones a diferentes niveles de concentración siempre duplicados para cada analito y cada matriz en diferentes tiempos. Los resultados se procesaron utilizando ANOVA obteniéndose los valores de repetibilidad y precisión intermedia. Resultados para la matriz músculo:

Compuesto	MATRIZ	LD (ug/kg)	LQ (ug/kg)	Rec media	S repet	S repro interm	U exp
Spinosad A + D	MU	8	25	93%	15% (< 100)	15% (< 100)	36% (< 100)
					9% (100-1500)	9% (100-1500)	18% (100-1500)
Cipermetrina	MU	5	10	105%	7% (10-250)	11% (10-250)	20% (10-250)
					12% (5-50)	12% (5-50)	27% (5-50)
Fipronil	MU	0.35	1.0	103%	10% (< 5)	18% (< 5)	36% (< 5)
					12% (5-50)	12% (5-50)	27% (5-50)
Fipronil sulfona	MU	0.35	1.0	97%	6% (< 5)	7% (5-50)	14% (< 5)
					5% (5-50)	9% (5-50)	18% (5-50)
Enrofloxacina	MU	8	20	101%	10% (< 50)	15% (< 50)	32% (< 50)
					6% (50-1500)	10% (50-1500)	19% (50-1500)
Ciprofloxacina	MU	8	20	97%	11% (8-850)	19% (8-850)	38% (8-850)
					11% (8-850)	19% (8-850)	38% (8-850)

(1) DETERMINATION OF CHLORFENVINPHOS, FIPRONIL, AND CYPERMETHRIN RESIDUES IN MEAT AND BOVINE FAT USING QUECHERS METHOD AND GAS CHROMATOGRAPHY/MASS SPECTROMETRY N. C. Sartorelli et al - Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies Volume 35, 2012 Issue 13

5. Conclusiones

El método demostró cumplir con los criterios de LD, LQ, selectividad, recuperación, repetibilidad, reproducibilidad intermedia, robustez, e

incertidumbre requeridos para estos métodos en los niveles de concentración validados para todos los analitos y todas las matrices estudiadas.